

PCT/JP 99/04197

04.08.99

日本国特許庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 27 SEP 1999

WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日

Date of Application:

1998年 8月 5日

出願番号

Application Number:

平成10年特許願第232382号

17/02

出願人

Applicant(s):

メルシャン株式会社

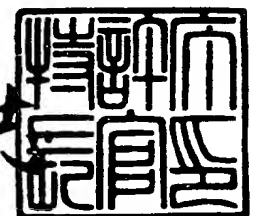
**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年 8月27日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

伴佐山 建志



出証番号 出証特平 11-3059849

【書類名】 特許願

【整理番号】 9808010

【提出日】 平成10年 8月 5日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/11
C12N 1/21
C12P 7/46

【発明の名称】 ホモグルタミン酸の生産に関与する遺伝子およびその使用

【請求項の数】 7

【発明者】

【住所又は居所】 東京都杉並区西荻北 4-39-4

【氏名】 藤井 匡

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県座間市南栗原 4-2-42-312

【氏名】 成田 隆夫

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県藤沢市立石 1-8-10

【氏名】 仲田 邦穂

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県藤沢市辻堂新町 1-2-7-1105

【氏名】 恒川 博

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県綾瀬市吉岡 1782-10

【氏名】 吉岡 武男

【特許出願人】

【識別番号】 000001915

【氏名又は名称】 メルシャン株式会社

【代理人】

【識別番号】 100060782
【弁理士】
【氏名又は名称】 小田島 平吉
【電話番号】 03-3585-2256

【代理人】

【識別番号】 100094293
【弁理士】
【氏名又は名称】 藤井 幸喜
【電話番号】 03-3585-2256

【代理人】

【識別番号】 100103311
【弁理士】
【氏名又は名称】 小田嶋 平吾
【電話番号】 03-3585-2256

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 019666
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1
【物件名】 受託証の写し 2

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ホモグルタミン酸の生産に関与する遺伝子およびその使用

【特許請求の範囲】

【請求項1】 フラボバクテリウム リュテセンス (*Flavobacterium lutescens*) に属する細菌から得ることのできる L-ホモグルタミン酸の生産に関与する遺伝子、あるいは該遺伝子において 1 もしくは数個のヌクレオチドが欠失、置換もしくは付加された改変体であって、L-ホモグルタミン酸の生産能を欠損した突然変異体の該生産能を回復しうる機能を有する改変体を含んでなる DNA。

【請求項2】 L-ホモグルタミン酸の生産に関与する遺伝子が、配列番号：2 に示される DNA 配列中の連続するヌクレオチド配列として存在するものであって、かつ L-ホモグルタミン酸の生産能を欠損した突然変異体の該生産能を回復する機能を有するものである請求項1 記載の DNA。

【請求項3】 L-ホモグルタミン酸の生産に関与する遺伝子が、配列番号：2 のヌクレオチド 2855 番目の ATG から 4387 番目の TAA までのヌクレオチド配列を有し、あるいは該遺伝子の改変体がフラボバクテリウム リュテセンスのピペリジン-6-カルボン酸デヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質をコードする請求項1 記載の DNA。

【請求項4】 L-ホモグルタミン酸の生産に関与する遺伝子、あるいは該遺伝子の改変体が自律複製性または組込み複製性ベクターの一部を形成する状態で存在する請求項1～3 のいずれかに記載の DNA。

【請求項5】 該ベクターが、フラボバクテリウム リュテセンス IFO3084 (pCF213) (FERM P-16699) から得ることのできる請求項4 記載の DNA。

【請求項6】 宿主としてフラボバクテリウム属に属する細菌を請求項4 または5 記載の DNA で形質転換した形質転換体。

【請求項7】 請求項6 記載の形質転換体を培地で培養し、培養中または培養後に、増殖した形質転換体を L-リジンまたは L-ピペリジン-6-カルボン酸と接触させ、L-ホモグルタミン酸に変換し、こうして生産された L-ホモグルタミン酸を回収することを特徴とする L-ホモグルタミン酸の生産方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、遺伝子操作に関し、より具体的には、L-ホモグルタミン酸（またはL-2-アミノアジピン酸もしくはL- α -アミノアジピン酸とも称されている）の生産に関与する遺伝子を含むDNA、ならびにそれらを使用するL-ホモグルタミン酸の生産系に関する。

【0002】

【発明の背景】

L-ホモグルタミン酸は、細菌であるコレラ ビブリオ (*Cholera vibrio*)、トウモロコシをはじめとする植物体、カエルの胚など、生物界に広く見いだされている。真菌類などにおいてはリジン生合成の中間体として、 β -ラクタム系抗生物質の生合成においては前駆体としての位置を占めている。また、L-ホモグルタミン酸は、メトトレキセート誘導体 (WO 92/09436) を始めとする各種医薬品の合成中間体としても有用である。

【0003】

ところで、L-ホモグルタミン酸の化学合成による製造は光学分割や多段階反応を必要とすることから、コスト的に有効な手段とはなっていない。一方、*Agrobacterium* (アグロバクテリウム)、*Klebsiella* (クレブシエラ)、*Alcaligenes* (アルカリゲネス)、*Brevibacterium* (ブレビバクテリウム)、*Bacillus* (バチルス) 属に属する微生物を用いて、L-リジンから製造する方法 (特開平6-181787号公報) が知られている。また本発明者らの一部も、フラボバクテリウム (*Flavobacterium*) 属に属する微生物を用いて、L-リジンからL-ホモグルタミン酸の製造方法を提供した (WO 96/31616)。しかしながら、これらの微生物を用いる方法も、さらに効率よくL-ホモグルタミン酸を製造できる方法が切望されている。

【0004】

そこで、本発明者らは、上記いずれかの微生物におけるL-ホモグルタミン酸の生産系を、例えば遺伝子操作により増強することを目差した。かような操作の

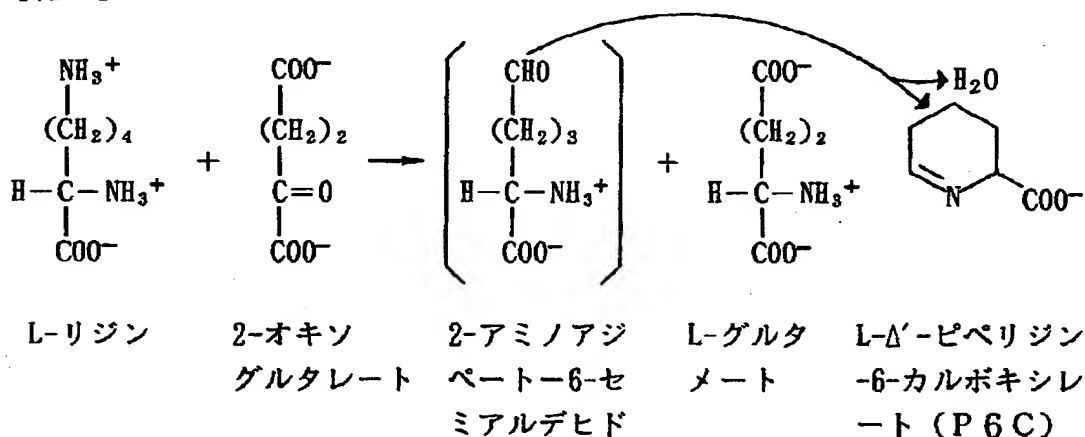
参考にする情報について概観すると、例えば、セファマイシンCの生合成経路の研究の一端として、セファマイシンC生産菌であるストレプトマイセス クラブリゲルス (*Streptomyces clavuligerus*) のL-リジンから α -アミノアジピン酸 (または、L-ホモグルタミン酸) への変換に関与するリジン-6-アミノトランスフェラーゼや、 Δ -1-ピペリジン-6-カルボン酸デヒドロゲナーゼの存在、また、前者については、該酵素をコードする遺伝子の位置等が確認されている (Fuente et al., *Biochem. J.* (1997) 327, 59-64)。

【0005】

また、L-リジンのバイオアッセイに用いられているフラボバクテリウム リュテセンス IFO 3084について、下記のような経路を触媒する2-オキソグルタル酸6-アミノトランスフェラーゼ [またはリジン6-アミノトランスフェラーゼ (以下、LATともいう)] が存在することが知られている (Soda et al., *Biochemistry* 7 (1968), 4110-4109, 同4110-4119)。

【0006】

【化1】



【0007】

なお、上記バイオアッセイでは、P6Cを α -アミノベンズアルデヒドと反応させて得られる生成物の吸光度が測定されている。また、L-リジンの別のバイオアッセイでは、アグロバクテリウム ツメファシエンズ (*Agrobacterium tumefaciens*) のL-リジン6-デヒドロゲナーゼ活性が利用されている (Misono et

al., J. Biochem. (Tokyo) 105 (1989), 1002-1008)。

【0008】

【発明の構成】

上記IFO 3084株は、上記のごとくL-リジンのバイオアッセイに常用されており、使用方法も確立されている。したがって、該IFO 3084株がLATに加えて、P6C（または、生体内では量的に平衡状態にあるといわれる2-アミノアジピン酸セミアルデヒド）のデヒドロゲナーゼ活性タンパク質をコードする遺伝子を有するなら、本発明の目的、すなわち、L-ホモグルタミン酸の生産に関与する遺伝子を提供するとの目的に沿った遺伝子クローニング用の候補菌となり得るであろう。

【0009】

本発明者らは、フラボバクテリウム リュテセンスのリジン-6-アミノトランスフェラーゼ（LAT）遺伝子（lat）および、場合によって、ピペリジン-6-カルボン酸（P6C）デヒドロゲナーゼ活性タンパク質をコードする遺伝子のクローニングを試みてきた。かようなクローニング方法として、他の細菌のアミノトランスフェラーゼとのDNAコンセンサス配列から目的の遺伝子を取得する方法や精製されたタンパク質のアミノ酸配列の決定から得られる情報を利用する方法などは、いずれも失敗に帰した。

【0010】

ところが、意外なことに、本発明者が、最終的に選択した宿主-ベクター系を使用すれば、ショットガンクローニングにより、少なくともL-ホモグルタミン酸の生産に関与する遺伝子をクローニングできることを見い出した。また、かような遺伝子の一定の改変体も同様に機能することも見い出した。

【0011】

したがって、本発明によれば、フラボバクテリウム リュテセンス (*Flavobacterium lutescens*) に属する細菌から得ることのできるL-ホモグルタミン酸の生産に関与する遺伝子、あるいは該遺伝子において1もしくは数個のヌクレオチドが欠失、置換もしくは付加された改変体であって、L-ホモグルタミン酸の生産能を欠損した突然変異体の該生産能を回復する機能を有する改変体を含んで

なるDNAが提供される。

【0012】

さらに、かような遺伝子で形質転換した形質転換体およびその使用によるL-ホモグルタミン酸の生産方法も提供される。

【0013】

【発明の具体的な態様】

本発明に従う遺伝子の起源としては、例えば、フラボバクテリウム リュテセンス（以下、*F. lutescens* ともいう）を宿主として発現しうるL-ホモグルタミン酸の生産に関与する遺伝子を提供するものであれば、自然突然変異株を包含する *F. lutescens* の如何なる菌であってもよい。しかし、入手容易であり、培養等の好適な取り扱い条件が確立されている、上記IFO 3084株を好ましいものとして挙げることができる。

【0014】

本発明にいう、L-ホモグルタミン酸の生産に関与する遺伝子とは、L-リジンからP6Cまたは2-アミノアジピン酸-6-セミアルデヒドを経てL-ホモグルタミン酸に至る2段階の変換系に関与しうるいずれかの遺伝子を意味する。この具体的なものとしては、本発明者らが以下のような戦略に基づいて確立した宿主-ベクター系を使用して得ることのできるものが挙げられる。

【0015】

F. lutescens の遺伝子操作を行うためには、*F. lutescens* の宿主-ベクター系の確立が必要であるが、これには次の3つの課題を解決する必要がある。

【0016】

- (1) *F. lutescens* 内で自律複製するレプリコンを得る。

【0017】

- (2) *F. lutescens* 内で発現機能する薬剤耐性マーカーを得る。

【0018】

- (3) *F. lutescens* 内へのDNA導入法を確立する。

【0019】

上記(1)および(2)の課題は、幸運なことに、最近 Mo Bi Tec 社より発

売された、広範囲のグラム陰性細菌で自律複製し、カナマイシン、クロラムフェニコール耐性を有する pBBR122 を使用できることを見出し解決できた。次に、上記(3)の課題解決には、まず、上記プラスミド pBBR122 の *F. lutescens* 内への導入法が確立されることが前提になる。ところが、エレクトロポレーション法による *E. Coli* への DNA 導入法をもとに検討した結果、カナマイシン $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ を含む L プレートに *F. lutescens* のコロニーが生え、これを液体培養してアルカリ SDS 法によってプラスミドを抽出したところ pBBR122 は安定に *F. lutescens* に保持されていることを確認できた。こうして、上記(3)の課題も解決できた。この宿主-ベクター系は、(a) 形質転換効率が非常に高く、(b) 適当な大きさの DNA 断片を pBBR122 に挿入できることが知られており (J. Bac. 178 (1996), 1053-1060)、取得した遺伝子を *F. lutescens* 内で増幅することが可能にしたばかりでなく、lat や L-ピペリジン-6-カルボン酸デヒドロゲナーゼ活性タンパク質をコードする遺伝子をショットガンクローニングによって取得することも可能にした。さらに操作を容易にすべく pBBR122 のクロラムフェニコール耐性遺伝子の代わりに pUC19 のマルチクローニングサイトを導入した pCF704 を作成し、これを以後ベクターとして用いた。

【0020】

次に、取得または増幅した遺伝子を評価する系を確立するため、*F. lutescens* IFO 3084 に N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (NTG) により突然変異を誘発させた。

【0021】

こうして取得した、L-ホモグルタミン酸を全く生産しない第一変異株とわずかししか生産しない第二および第三変異株を取得した。この L-ホモグルタミン酸を全く生産しない第一変異株には野生型株と同等の lat 活性が確認され、わずかししか生産しない第二および第三変異株には lat 活性がわずかししか確認されなかった。

【0022】

次に、野生型株のゲノム DNA を *Sau*IIIHI で部分消化し、その 6-8 Kbp

断片をpCF704のBamHI部位に挿入したDNAライブラリーを作成した。これらを上記第一、第二および第三変異株にそれぞれ導入し、L-ホモグルタミン酸生産能を回復する株をスクリーニングした。この際、変異株のスクリーニングに使用したエオジンYを含むMEMプレート(pH7.0)で黒くなるコロニーを拾い、TLCでL-ホモグルタミン酸生産能を確認するという方法を用いた。なお、これらの変異株の代表的なものとし、第二変異株(Flavobacterium Intescens 2nd mutant)は、平成10年7月6日付で工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託され、受託番号FERM P-16874が付され、保管されている。

【0023】

この結果、第一変異株のL-ホモグルタミン酸の生産性を相補するプラスミドを有する株および第二変異株のL-ホモグルタミン酸の生産性を部分的に相補するプラスミドを有する株がそれぞれ得られた。しかし、これらの株、特に第二変異株を相補する株のプラスミドは欠失が起きやすらしく、安定なプラスミドを取得するためのスクリーニングが必要であった。制限酵素処理によるDNAフラグメント解析の結果、こうして得られた第一変異株を相補し、pCF111と命名したプラスミドと第二変異株を部分的に相補するpCF213と命名したプラスミドは見かけ上全く同一のプラスミドであった。

【0024】

一方、pCF111およびpCF213を第一、第二および第三変異株にそれぞれ再形質転換し、L-ホモグルタミン酸生産能をTLCで調べた。この結果両プラスミドともに第一変異株を相補したが、第二および第三変異株は部分的に相補しただけであった。

【0025】

かような相補試験の結果、L-ホモグルタミン酸の生産性が欠損した変異株のL-ホモグルタミン酸生産能を十分に回復するプラスミドには、本発明に従う少なくともL-ホモグルタミン酸の生産に関与する遺伝子が存在することになる。

したがって、限定されるものでないが、本発明にいう「L-ホモグルタミン酸の生産に関与する遺伝子としては、プラスミドpCF213のインサート部分に

含まれる遺伝子を挙げることができる。例えば、配列番号：1に示されるDNA配列中の連続するヌクレオチド配列として存在するものであって、かつL-ホモグルタミン酸の生産能を欠損した突然変異株の該生産能を回復する機能を有する遺伝子を含んでなるものが挙げられる。本発明のDNAは、上記のような遺伝子それ自体からなるか、または該遺伝子の一部を含む単離されたDNAである。該遺伝子を含むDNAにおける遺伝子以外のヌクレオチドは、*F. lutescens* のゲノム由来であっても、外来のものであってもよい。該ヌクレオチドが *F. lutescens* のゲノムに由来する場合の、本発明のDNAの具体的なものとしては、配列番号：1で示されるものを挙げることができる。

【0026】

また、本発明のDNAは、上記遺伝子の改変体であって、該遺伝子における1もしくは数個のヌクレオチドが欠失、置換もしくは付加されたものを含んでいてもよい。しかし、このような改変体は、上記遺伝子と同様な機能、すなわちL-ホモグルタミン酸の生産能を欠損した *F. lutescens* の変異株のL-ホモグルタミン酸の生産能を回復しうる機能を有するものに限定される。

【0027】

上記遺伝子の1もしくは数個のヌクレオチドが置換した改変体の典型的なものとしては、遺伝コードの縮重により上記遺伝子と同一のアミノ酸配列をコードするような改変体を始め、上記遺伝子の機能に悪影響を及ぼさない範囲でヌクレオチドが置換した改変体を挙げることができる。

【0028】

また、ヌクレオチドの欠失および付加も、上記遺伝子の機能を発揮しうる範囲であれば、そのような欠失および付加を伴う改変体を含むDNAも本発明の範囲内のものである。かような改変体は、配列番号：1に示されるヌクレオチド配列を参考に、それ自体既知の核酸合成機を用いて生成するか、あるいは、点突然変異誘発または部位特異的突然誘発により生成することにより提供できる。こうして得られる改変体から、上記のようなL-ホモグルタミン酸の生産能を回復しうるものを選ぶことにより、本発明でいう改変体を提供しうる。

【0029】

本発明に従うDNAは、上記のような遺伝子または改変体を含み、組換えベクターの状態であることもできる。かようなベクターは、上記遺伝子または改変体以外に、自律複製配列、プロモーター配列、ターミネーター配列、薬剤耐性遺伝子等を含む自律複製性であることができる。さらに、ベクターは、使用が予定される宿主のゲノムの一定領域と相同の配列を含め、組込み型ベクターであることもできる。上記自律複製性の組換えベクターとしては、プラスミド pBBR122 に上記遺伝子または改変体を担持させたものや、pBBR122 の特定の部位にマルチクローニング部位を挿入するかまたは該部位もしくは領域をマルチクローニング部位で置換し、そのマルチクローニング部位を介して上記遺伝子や改変体を挿入したものが挙げられる。このようなベクターの具体的なものとしては、本明細書でプラスミド pCF111 および pCF213 と称するものを挙げることができる。pCF213 は、平成10年3月11日付で工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託され、受託番号 FERM P-16699 が付された、*Flavobacterium lutescens* IFO 3084 (pCF213) から、それ自体既知のプラスミド単離法により得ることができる。

【0030】

本発明によれば、さらに、宿主としてフラボバクテリウム属に属する細菌を、上記組換えベクターで形質転換して得られる形質転換体も提供される。フラボバクテリウム属に属する細菌は、本発明の目的に沿う限り、如何なる種の如何なる株であってもよいが、好ましいものとしては、*F. lutescens* IFO 3084 および *F. lutescens* SP.7-1 (FERM BP-5457) を挙げることができる。

【0031】

したがって、上記形質転換体の代表的なものとしては、*F. lutescens* IFO 3084 および *F. lutescens* SP.7-1 を pCF213 で形質転換したものを挙げることができ、特に好ましいものは、上記 FERM P-16699 で生命工学工業技術研究所に寄託されている *F. lutescens* IFO 3084 (pCF213) である。

【0032】

本発明によれば、また、上記形質転換体を用いる L-ホモグルタミン酸の生産方法が提供される。かような方法では、培地で培養中に増殖した形質転換体を、出発原料、L-リジンまたは L-ピペリジン-6-カルボン酸（もしくは 2-アミノアジピン酸-6-セミアルデヒド）と接触させるか、あるいは増殖した形質転換体またはその処理菌体（例えば、有機溶媒処理物、菌体抽出物、固定化処理物）と接触させ、出発原料を L-ホモグルタミン酸に変換する。

【0033】

培地の炭素源としては、形質転換体の利用可能なものであれば如何なるものも使用でき、宿主として、*F. lutescens* を用いた場合には、例えば、グルコース、フルクトース、シュクロース、デキストリンなどの糖類、グリセロール、ソルビトールなどの糖アルコール、フマル酸、クエン酸等の有機酸を使用でき、これらの炭素源の培地への添加量は、通常、0.1~10重量%（以下、%と略称する）程度とすることが望ましい。

【0034】

培地の窒素源としては、例えば、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸アンモニウム塩やフマル酸アンモニウム、クエン酸アンモニウム等の有機酸アンモニウム塩ないし、肉エキス、酵母エキス、コーンスティーブリカー、カゼイン加水分解物等の天然窒素源を使用でき、これらの窒素源の培地への添加量は、通常、0.1~10%程度とすることが望ましい。

【0035】

又、無機塩類としては、例えば、リン酸カリウム、リン酸ナトリウム等のリン酸アルカリ金属塩や塩化カリウム、塩化ナトリウム、等の塩化アルカリ金属塩、硫酸マグネシウム、硫酸第一鉄等の硫酸金属塩を使用でき、これらの無機塩類の培地への添加量は、通常、0.001~1%程度とすることが望ましい。

【0036】

これらのうち、通常の細菌用の増殖培地を用いた液体培養が好ましく、炭素源としてはグルコース、マルトース、澱粉などが、窒素源としては硫酸アンモニウム、ペプトン、酵母エキス、大豆粉などが特に有効である。その他に、無機塩と

してリン酸カリウム、硫酸マグネシウム、食塩などが通常用いられる。

【0037】

微生物の培養は、上記の培地で20～40℃、好ましくは28～37℃でpHは5～9、好ましくは6～8で好氣的条件下で実施すればよい。

【0038】

培養中に、上記により増殖した形質転換体と出発原料の接触は、予め培地に出発原料を加えておくか、または培養中に出発原料を適宜加えることにより行う。また、培養終了後に、集菌した菌体または処理菌体と出発原料を培地または適当な緩衝液中で、必要により適当な補酵素等を加え、反応器中で攪拌または振盪するか、固定された菌体上に出発原料含有物を流動させることにより、上記接触を行うことができる。

【0039】

培養中に形質転換体とL-リジンを接触させる場合を例に、さらに具体的に説明すると次のとおりである。培地に形質転換体を接種した後、例えば、20～40℃で12～120時間培養することにより、形質転換体である微生物を1ml中に $10^6 \sim 10^{10}$ 個含む菌株培養液を得、その培養液に原料化合物であるL-リジンを通常、最終濃度が0.5～30mg/mlになるように水または補助溶剤に溶解して加えるか、または溶解せずにそのまま添加し、通常、20～40℃で18時間～7日、好ましくは18時間～5日反応させ、陽イオン交換樹脂、陰イオン交換樹脂等を用いた各種イオン交換クロマトグラフィー、HP20などの吸着クロマトグラフィー、溶媒や温度を利用した沈殿化や結晶化等の通常の精製手段によりL-ホモグルタミン酸を得ることができる。

【0040】

添加するL-リジンの形状及び添加時期については特に制限されるものではないが、溶解性などの点から一塩酸塩として用いるのが好ましく、培養開始時の添加でもよく培養途中1～5日目にも添加してもよい。

【0041】

本発明によれば、L-リジンをL-ホモグルタミン酸に変換するL-ホモグルタミン酸の生産に関与する遺伝子を含むDNAが提供される。このDNAは、L

ーホモグルタミン酸の微生物学的な生産方法において有用である。また、本発明によれば、Lーホモグルタミン酸を効率よく生産しうる形質転換体およびその使用によるLーホモグルタミン酸の生産方法も提供される。

【0042】

【実施例】

以下、具体例により本発明をさらに詳細に説明する。

【0043】

(なお、Lーホモグルタミン酸は、単にホモグルタミン酸と略記する。)

1. ホモグルタミン酸非生産株の取得

F. lutescens IFO 3084株をL培地(ポリペプトン1.0%、酵母エキス0.5%、NaCl 0.5%、グルコース0.1%、pH7.2)3mlに植菌し、32℃で一晩振盪培養した。これを種菌としてその100μlをL培地50mlに植菌し、32℃で4.5時間振盪培養した。この培養液から菌体を5000×g、10分間の遠心分離で集菌し、0.2Mリン酸バッファー(pH6.0)で一回洗浄し、0.2Mリン酸バッファー(pH6.0)6mlに懸濁した。この菌体懸濁液に80mg/ml NTGを50μl加え、32℃で20分間振盪培養した。この培養液から集菌した菌体を0.2Mリン酸バッファー(pH6.0)で一回洗浄し、全量をL培地50mlに植菌し、32℃で一晩振盪培養した。この培養液を500μlずつ分注し、これに60%グリセロール溶液500μlを加えてよく混合し、-70℃で凍結保存したものを変異株保存液とした。

【0044】

この変異株保存液を0.85%NaClで10⁶倍希釈し、8cmシャーレのMEM寒天培地pH7.2(ポリペプトン0.5%、酵母エキス0.2%、リジン-HCl 1.0%、メチレンブルー0.006%、エオジンY0.04%、寒天1.5%、pH7.2)に100μlずつ塗布し、32℃で三日間培養した。生えてきたコロニーのうち白色を呈しているコロニーをスクリーニング培地(ポリペプトン1.0%、酵母エキス0.2%、リジン-HCl 1.0%、pH7.2)1mlに植菌し、32℃で二日間振盪培養した。この培養液3μlをシリカゲルTLCプレートの各レーンに滴下し乾燥させた。このプレートをブタノール：酢酸：

水 (3 : 1 : 1) からなる溶媒系で展開し、ニンヒドリン発色して各クレーン毎にホモグルタミン酸の有無を調べた。このようにして変異株の中から全くホモグルタミン酸を生産しない第一変異株と、ほんのわずかだけホモグルタミン酸を生産する第二変異株、第三変異株を分離した。L-リジンからホモグルタミン酸への変換能 (またはホモグルタミン酸の生産性) を TLC 分析により調べた結果を図 1 に示す。また、これらの変換株における lat 活性の測定結果を図 2 に示す。

【0045】

2. ホスト-ベクター系、形質転換系の構築

F. lutescens IFO 3084 株を L 培地 3 ml に植菌し、32℃で一晩振盪培養した。これを種菌としてその100μlをL培地50mlに植菌し、32℃で4.5時間振盪培養した。この培養液から菌体を5000×g、10分間の遠心分離で集菌し、10%グリセロール溶液で一回洗浄し、10%グリセロール溶液3mlに懸濁した。この懸濁液を200μlずつ分注し、-70℃で凍結保存したものをエレクトロセル保存液とした。この保存液を氷上で融解し、Broad Host Range Vector pBBR122 (Mo Bi Tec 社) 200μg/ml TE 溶液 1μlを加えた。これを0.2cmのエレクトロキュベット (Electrocuvette) (BIORAD 社) に入れ、ジーンパルサー (Gene Pulser) II (BIORAD 社) を用い2.4KV、200Ω、25μFの条件で一回電気パルスをかけた。このセルをファルコン (Falcon) チューブに入れ、氷冷したL培地1mlを加え、32℃で2時間振盪培養した。この培養液をカナマイシン20μg/mlを含むL寒天培地 (ポリペプトン1.0%、酵母エキス0.5%、NaCl 0.5%、グルコース0.1%、寒天1.5%、pH7.2) に塗布し、32℃で三日間培養した。2.4×10⁵個の形質転換株を得た。

【0046】

3. プラスミド pCF704 の構築

末端にEcoRIサイトとNcoIサイトを付着したプライマーを合成 (ファルマシア社) し、Taq ポリメラーゼ (Taq polymerase) (ファルマシア社) とPCRサーマルサイクラー (Thermal Cycler) PERSONAL (TaKaRa社) を用い、pU

C18のマルチクローニングサイトとその周辺領域95bpを増幅した。このDNA断片を制限酵素EcoRIとNcoIで消化し、pBBR122のEcoRI、NcoIサイトにLigation Kit version 2 (TaKaRa 社)を用いて連結反応した。この反応液でE. coli コンピテント細胞JM109 (TaKaRa 社)を形質転換して得た形質転換株からプラスミドpCF704をQIAGEN Plasmid Midi Kitを用いて調製した。

【0047】

4. プラスミドpCF213の構築

F. lutescens IFO 3084株のゲノムDNAをQIAGEN Blood and Cell Culture DNA Kitに従って抽出精製した。このゲノムDNAを制限酵素SauIIIAIで部分分解し、その6~8Kbp断片をアガロースゲルから切り出し、ウルトラフリーC3ユニット0.45 μ m (ミリポア社)を用いてDNAを回収精製しTE溶液に溶解したものをインサートDNA溶液とした。一方、pCF704を制限酵素BamHIで消化し、アルカリ性ホスファターゼで脱リン酸化した。これとインサートDNA溶液とをLigation Kit version 2 (TaKaRa 社)を用いて連結反応したものをDNAライブラリーとした。

【0048】

このDNAライブラリーを第二変異株(FERM P-16874)のエレクトロセル保存液に加え、電気パルスをかけた。このセルをFalcon チューブに入れ、氷冷したL培地1mlを加え、32℃で2時間振盪培養した。この培養液全量をカナマイシン20 μ g/mlを含む50ml L培地に植菌し32℃で二日間振盪培養した。この培養液を500 μ lずつ分注し、これに60%グリセロール溶液500 μ lを加えてよく混合し、-70℃で凍結保存したものを相補株保存液とした。

【0049】

この相補株保存液を0.85%NaClで10³倍希釈し、8cmシャーレのMEM寒天培地pH7.0 (ポリペプトン0.5%、酵母エキス0.2%、リジン-HCl 1.0%、メチレンブルー0.006%、エオジンY0.04%、寒天1.5%、pH7.0)に100 μ lずつ塗布し、32℃で三日間培養した。一面に

生えてきた菌体のうち黒色を呈している部分を相補株混合菌体とした。この相補株混合菌体をスクリーニング培地3mlに植菌し、32℃で二日間振盪培養した。この培養液3μlをシリカゲルTLCプレートの各レーンに滴下し乾燥させた。このプレートをブタノール：酢酸：水（3：1：1）からなる溶媒系で展開し、ニンヒドリン発色して各レーン毎にホモグルタミン酸の有無を調べた。このようにしてホモグルタミン酸生産能を回復している相補株混合菌体を選び、さらにシングルコロニーに分離し、ホモグルタミン酸生産能を回復している株を選んだものを相補株とした。この相補株をから QIAGEN Plasmid Midi Kit を用いて調製したプラスミドを pCF213 とした。pCF213 には約 6.5 Kbp のインサート DNA が挿入されていた。なお、別途得られたプラスミド pCE111 の各変異株に対する相補性と共に、上記 pCF213 の相補性を調べた結果を、図3に示す。

【0050】

5. pCF213によるホモグルタミン酸生産能の向上

pCF704で野生型 *F. lutescens* IFO 3084株を形質転換した株を Wild pCF704株、pCF213で形質転換した株を Wild pCF213株とした。両者をカナマイシン20μg/mlを含むスクリーニング培地3mlに植菌し、32℃で一晩振盪培養した。これを種菌としてその100μlを生産培地（ポリペプトン1.5%、酵母エキス0.5%、リジン-HCl 2.0%、pH無調整）25mlに植菌し、32℃で24時間、48時間、72時間それぞれ振盪培養した。この培養液の上清中のホモグルタミン酸量をHPLCで測定した。すなわち培養液をアミノ酸総濃度で1000mg/L程度になるよう蒸留水で希釈し、50μlを試験管に移し減圧乾固した。ここにフェニルイソチオシアネートとトリエチルアミンとエタノールと蒸留水を1対1対7対2で混合した溶液を50μl加え、攪拌溶解、10分間室温においた後減圧乾固した。これHPLCの移動相A溶液500μlに溶解、5μlをインジェクトした。HPLC条件を下記に示した。

【0051】

カラム：TSK-GEL super-ODS 4.6 ID×50mm

移動相：A溶液 140 mM 酢酸ナトリウム-0.05% トリエチルアミンを氷酢酸でpHを6.2に調整した溶液1000対アセトニトリル40

B溶液 70%アセトニトリル

流速：2.0 ml/min

溶出条件：流速一定のグラジエント、0分から7分までB溶液2%から40%へのリニアグラジエント、7分以降B溶液100%

検出：UV254 nm

温度：40℃

この条件でホモグルタミン酸の保持時間は1.3 min、リジンは7.7 minであった。

【0052】

この結果図4に示したように野生型pCF213株は野生型pCF704株の1.5倍のホモグルタミン酸生産能を有した。

【0053】

6. pCF213 インサート領域の遺伝子塩基配列の決定

pCF213 インサート領域について ABIPRISM 377XL DNA Sequencer (Perkin Elmer 社) を用いプライマーウォーキング法により塩基配列を決定した。この塩基配列を配列番号：1に示した。

【0054】

決定された塩基配列をもとに Bibb らの方法 (Gene, 30, 157 (1984)) に従ってオープンリーディングフレーム (ORF) を調べた。その結果図5に示したORFを見いだした。

【0055】

7. pCF213 インサート領域のNot I 部位約2.5 Kbpの解析

pCF213 インサート領域のうち制限酵素Not I 部位約2.5 Kbp (配列番号：1の塩基配列2077-4578位) について解析を行った。このNot I 部位約2.5 Kbp をアガロースゲルから切り出し、ウルトラフリーC3ユニット0.45 μm (ミリポア社) を用いてDNAを回収精製しTE溶液に溶解

し、DNA Blunting Kit (TaKaRa 社) に従って末端を平滑化したものをインサート DNA 溶液とした。一方、pCF704 を制限酵素 *HincII* で消化し、アルカリ性ホスファターゼで脱リン酸化した。これとインサート DNA 溶液とを Ligation Kit version 1 (TaKaRa 社) を用いて連結反応した。この反応液で *F. lutescens* IF03084 株を形質転換して得た形質転換株から、プラスミド pCF235 を QIAGEN Plasmid Midi Kit を用いて調製した。

【0056】

pCF235 で形質転換した第一変異株をスクリーニング培地 3 ml に植菌し、32℃で二日間振盪培養した。この培養液 3 μ l をシリカゲル TLC プレートの各レーンに滴下し乾燥させた。このプレートをブタノール:酢酸:水 (3:1:1) からなる溶媒系で展開し、ニンヒドリン発色して各レーン毎にホモグルタミン酸の有無を調べた。この結果 pCF235 で形質転換した第一変異株はホモグルタミン酸生産能を回復した。

【0057】

なお、pCF235 に組み込んだ DNA 配列約 2.5 Kbp には、配列番号: 2 の塩基配列 2855 番目の ATG から始まり 4387 番目の TAA で終わる 510 アミノ酸からなる ORF が存在した。このアミノ酸配列を BLAST によるホモロジーサーチにかけた結果、種々のアルデヒドデヒドロゲナーゼと高い相同性を示し、さらに最近データベースに登録された *Streptomyces dlavuligerus* のピペリジン-6-カルボン酸デヒドロゲナーゼのアミノ酸配列と全域にわたり高い相同性を示した。pCF235 で形質転換した第二変異株がホモグルタミン酸生産能を回復したこと、および野生型 pCF213 株のホモグルタミン酸生産能が向上したことを考え合わせると、この ORF がコードする蛋白質はピペリジン-6-カルボン酸デヒドロゲナーゼであると推測された。

【 0 0 5 8 】

【配列表】

配列番号 : 1

配列の長さ : 6 3 5 7

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

配列の特徴

特徴を表す記号 : insertion seq

特徴を決定した方法 :

配列 :

```

GGATCGGGCC ACTGGGCTCA CTGCTGGACG CAATCCGAGT GCCGGGATGG CTCGGGTTGA 60
AGGTGTTGCG GATCACGATC GGCATCTGCC GGGCGATGGC CGGGCTCATC GTCTGCGGGT 120
GCACCACCTT GGGCGCGAAA TAGGCCAGTT CGCAGGCCTC GTCATAGCTG AGCGTGGCCA 180
GGGTACCCGC CTCGGGCACC ACCCGCGGGT CGGCCGACAG CACACCGTCG ACATCGGTCC 240
AGATGTGCAG CTCGGCCGCC TCGAACAGCG CGGCAAAGAT CGCCCCGAA TAATCGCTGC 300
CGTTGCGGCC CAGGGTGGTG ATCCTGCCCT GGCCATCACG GCGGACAAAA CCGGTGACCA 360
CCACCCGCGA CTGCGGGTTG TCCACACGCC AGGCGGCCAG GTTGGCCGCA CTGCGTTCCC 420
AGTCGACGCT GACCCCCAGC TCGCCGTGTG CGACCACCAG CACATCGCGG GCATCGAGCA 480
CCGCGCAGGG GTGGCCGAGC CGGTTGAAAT AGCGGCCCAG CAGCTGGGCC GAGAACACCT 540
CGCCCAGCCC CTGCACCCTT TCAAGCACCT CCTCGGGCAG GCCGCCGATC ACCGCCAGCG 600
CTTCCAGCAA CCCGGCCAGC TTGTCAAAGC GTCCATCCAG CCACTGCAGC AGGTGCGCAG 660
AATCCTCGCC CAGCAGTTCG GTGGCCGCTT CATGGTGGCG CTGGCGCAGG GCCTGCCAGG 720
CATCACGCCA GCGCGGCTGA CCGTGGGCGG CCAGGGTAGC CAGCTCGATC AAGGCATCGG 780
TGACACCCTT CATCGCCGAG ACCACCACCA CCTGGGTGGG TTCCGGGCGC TGCAGCAGCA 840
ACTCGGCGAC ATGGCGGTAG CGCTGCGCCG AGGCCACCGA GGTGCCGCCG AACTTGTGGG 900
CGATGACCTG GGCATCGGGC GCGGGAGCGG GAGCGGGTGC AGCGGCAGGC GATGACATCA 960
CAACAGACCT CTGGGGTTGA GGCCCGGCAC CGCAGGTTGC GAAGTCCCGC AACCTGGTCG 1020
    
```

GTGCGGGGCC GTTGTTCG GGGGTTAGAC GAATACGACG GGCCGCACCA GCCAAGTGGT 1080
 GGTGGTAATG ATGGTCATGC CGGTGACGCC AGCAGGCGCC AGCAGGGCGG CAGTGGAATC 1140
 AACGGTGGCG CGGCAGATCG ACATGCAGCG AGCAGACCGC ACAGCGCCTG CTGCTGTCAA 1200
 CTGTTGCATT GCAAAATAAT TTTCCGCGCA TCATCGGCGA ACATGCACCG ATTTGGTTGC 1260
 AAATGTGATC GTCAGCGATC TTCTGTCAAA ACCCGCGGAT CAAGCGGCCA CAGCCGCTGC 1320
 GGCAGCCGCG GACCACCGCG CGCCGATGCC AGCGCCGGG GGCAGAGCAA GCCGCCAGCG 1380
 CAACCGGCCA TTACCGCGGC CAGGCGCCGG GCCTGCGCGG CTCAACCGTG GATTTTTTCC 1440
 CAGCGGGCGT GGGCCTGCGC GGCCAGCACC ACCCGCCGA CCAACAGCGC AATGGCCAGC 1500
 AGCTCCAGCA GGGTCGGGCC ACGCTGCTGC CAGATGAAGC CATAAAGCAA CGCGAACAGG 1560
 GTTTCAAACA CGATCAGCTG CCCGCCAGG CTCAGCGGCA GGCTGCGCGT GGCCCGGTTT 1620
 CAGCAGGCAT TGCCAGCAC CGAGGCACCG ACGGCCAGCA GCGCACAGAT GCCGGCAAAG 1680
 TGCAGCCACT GGCCCTGGCT CTGCCCAGC GGCCCCAGCC ACAGCGCCAG CGGCAGCAAC 1740
 AGCACGGCGA TGGCCCTGT GGCCACCCCG GTCAACAACG ACCAGGCATG CCCGGACAGG 1800
 TGCGGATAGC GCCGCATCCA CACCACATTG GCGATCGAGT AGCCACTCCA GGCGGCCAGC 1860
 GCGGCCAGCG CGCAGAGCAG GCCCAGCACC CGCTGACCGA TGTCCCTGCC AGCATCGCCC 1920
 GCCGCGCCCG CGCCGTGGCC GAGTGCAGCC CAGGCCACCA GCAGCGAGCC CAGCACACAC 1980
 AGGCACAGCG CCGGTGCCAG CTGACGCAAC GGCAGGGCCG TTGGCCGCCG CGCATCCACC 2040
 GCCGCCACCA CCACCGGCAC CATGCCACG ATCAGCGCGG CCGCCGCACC GCCAGCCAG 2100
 TGCACGGCCA TCGCCAGAAA CACGAAATAG ACCAGGTTGC CGAGCAGGCT CAGCCCGGCC 2160
 AGGGCCAGCC AGGCGCGGCG ATCGACCTGC GCACGCAGCG CCGGCCACAA CGGCAGCAGC 2220
 AACGCACAGG CCACCGCACC GTACAGCAGG TAGCGGCCA CGGCCAGCTG CAGCGCAGAA 2280
 AATGCGGTGG TCAAGGCCCG CGCCAGGAAC ACCATGCCCC ACAGGGCACC GGCGAGCACG 2340
 CCGTTGAACA GTCCCCACGC GGTCTGGTTG TTGCGCTGGA TCACGCTGCA AGGCCCTGCA 2400
 ATGAACAACA GGCCGGGGCG GCGCAGCGCA TGGGCGCTGG CAGCTCTCCG ACCTGTGCAA 2460
 AGGTGGTGGC CCCGACACGA TTCGAACGTG CGACCTGTCC CTTAGGAGGG GACCGCTCTA 2520
 TCCAGCTGAG CTACGGAGCC ATGAGGCCGG CGATTCTAGC ATCCGCTCTC CGTTCACGGC 2580
 CATCGCCCGC AGCCGCAGTT CACAGTGACG GGCAACCGCA GCAAGCCCCC GCCCGCTGC 2640
 AACCTCGCG CCCGCGCGCA ACGTGACCGG CGCCGCGGCA GGCCCGGCC CCACGGCCAC 2700
 TGGCGCCGGT TCCGCACCAC GCCACCGCA ACACGCCCC AGCCCTGCCC AACGTGGTGT 2760

TTCAGCGCTC TGTTAAGATG GCATGCCAC ATGCCACCTC CCCCCGGACG CGCCGCGGGT 2820
 GCGTGACCTT TTCGTAACGT AATCTGGAGT TTCCATGTCT TTTGAACTGC TCAAGGCCTT 2880
 AGGGCTGGAC GCCACCAATT CCGGCACCTA CCTGGGTGAT GGAGAATGGT CCAGCGCTAC 2940
 CCGTGCCGGG ACCATCAGCC CGCGCAACCC GACCACCGGC GAGGTCATTG CCCAGGTCCA 3000
 GGCCACCACC GAGGCGGACT ACGAAACCAT CCTGGCCCCG GCCCAGCAGG CCTTCAAGGT 3060
 CTGGCGCACC ACCCCGGCAC CGCGCCGCGG CGAGGCCATC CGCCTGTGTG GCGAGGCCCT 3120
 GCGCCGCCAC AAGGACGCGC TGGGTTTCGT GGTGCGCTG GAAATGGGCA AGTCCAAGCC 3180
 GGAAGGCGAC GCGAAGTCC AGGAAATGAT CGACATCGCC GACTTTGCCG TCGCCAGAG 3240
 CCGCATGCTG TATGGCTACA CCATGCACAG CGAGCGCCCC GGCCACCGCA TGTACGAGCA 3300
 GTACCAGCCG CTGGGCATCG TCGGCATCAT CTCGGCCTTC AACTTCCCGG TCGCGGTCTG 3360
 GGCCTGGAAC AGCTTCCTGG CCGCGATCTG TGGTGATGTC TGCATCTGGA AGCCGTCCAA 3420
 CAAGACCCCG CTGACCGCGA TCGCGTCCAT GCGCATCTGC AACGAAGCAC TCGCGAAGG 3480
 CGGCTTCCCG GACATCTTCT TCCTGATCAA CGACGCCGGC ACCGCGTTGT CGGAGAAGCT 3540
 GGTGAGGAC AAGCGCGTGC CGCTGATCTC CTTACCGGC TCGACCCAGG TCGGGCGCAT 3600
 CGTCAACCAG AAGGTCGCCG CCCGCCTGGG CCGCTGCCTG CTCGAGCTGG GCGGCAACAA 3660
 CGCGATCATC CTGGACGAAA CCGCCGACCT GAAGCTGGCC GTGCCGGGCA TCGTCTTCGG 3720
 CGCCGTCGGC ACCGCCGGCC AGCGCTGCAC CACCACCGC CGCCTGATCG TGCACGAATC 3780
 GATCTACGAC AACGTGCTGG CCACCTTGAT CAAGGCCTAC AAGCAGGTCG AAGGCAAGAT 3840
 CGGGCATCCG CTGGATGCCG CCAACCTGAT GGGCCCCTC AACAGCCCCG AAGCGGTGCA 3900
 GCAGTTCCTG GCCTCGATCG AGAAAGCCAA GGCCGCTGGC GGCACCGTTC AAACCGGTGG 3960
 TACCGGATC GACCGCCCGG GCAACTTCGT GCTGCCGGCC ATCGTCACCG GCCTGAAGAA 4020
 CAGCGATGAG GTGGTCCAGC ACGAGACCTT CGCCCCGATC CTGTACGTAA TGAAGTACTC 4080
 CACCCTGGAC GAAGCCATCG AGATGCAGAA CGGCGTGCCG CAGGGCCTGT CCTCGTCGAT 4140
 CTTACACACG AACCTGAAGG CAGCCGAGAA GTTCTGTCTG GCGGCCGGCA GCGACTGCGG 4200
 CATTGCCAAC GTCAACATCG GCACTTCCGG TGCCGAGATC GGCGGCGCCT TCGGTGGCGA 4260
 GAAGGAAACC GCGGTGGCC GTGAGTCCGG CTCGGATGCG TGGAAGGTCT ACATGCGCCG 4320
 CCAGACCAAC ACCATCAACT ACTCCGACTC GCTGCCGCTG GCCCAGGGCA TCAAGTTCGA 4380
 CCTGTAAGCC GCTCGCCACG GCGCGCCTTC CCCGGAAGCA GGCCGTGGCT GTTGCACCAG 4440
 CCAGAGGAGT GACTGCATGA CTGCAATTGA ATCGACTGCC GCACGCACCA CCAACACTTG 4500

CGCCATCCTG TCGCTGGTAC TGGCACTGCT GGGCTGGAAT CTTTGTCCGG TGATTGGCTT 4560
 TGTCGGCGCC ATCATCTGCG GCCGCATCGC CCAGCGCCAG CTCAAGCAGC CCGGCAATAC 4620
 CCAGGACGGT CACGGCCTGG CAAGGGCGGG CATCTGGATC AGTTGGATCA GCCTGATCCT 4680
 GGTTCGCTG CTGATCGGCG TCGTGATCCC GTGGTTGACC GCCCCGATCA CGATCAACCT 4740
 GCCCGTTTCC ACCTGACCCT CCTCCCTGCC AGTCGCCCAT GCGCTGACAG GCCAACCCGT 4800
 TTCCTGCCTG GACCAGACCA TGCTCCCGCC CGACCATCCG GCTCCACCAT CGCCATTGC 4860
 CGGCACCACA ACCTCGACCA ATGGCTATGC GGTGGCCTCG CTGGTGATGG GCATCCTTGG 4920
 CTGGTCGATG ATCCCGCTGT TGGGCAGCAT CGGCGCCATC GTGTTCGGGC ATCTGGCCCG 4980
 GGCGCAGATC CGTCGCCAGC CCCAGCAGGG CGATGGCCTG GCACTGGCCG GGCTGATCCT 5040
 GGGCTGGATC TCGATTGCGC TGTGGATCCT CGGGATCCTG GCGTTTTTCC TCTTCTTTGG 5100
 CGGGCTGGCC ATGCTGCTCA GCCTGAACGC CTGACCCGAG CCTTGCCGTA TGTATTCCCT 5160
 GCTCCGTCCC GCCCTGTTCT GCATGGATGC CGAGCGCGCC CATGGCGCCG GCCTGCGCGC 5220
 CCTGGATCTT GCCTACCGCA GCGGTACGCT GGGGCTGCTG GCCAGCCGGC CAGCACCCT 5280
 TCCAACCCGC GCTTTCGGCC TGAATTCCC CAACCCGGTG GGCCTGGCGG CCGGCCTGGA 5340
 CAAGAACGGC GAGCATATCG ATGCACTGTT CGCGCTGGGC TTTGGCTATG TCGAAATCGG 5400
 CACGGTGACC CCGCGCCCGC AGGCCGGCAA TCCGCAGCCA CGGCTGTTCC GCGTGCCCGA 5460
 GCACCTGGGC GTGATCAACC GCATGGGTTT CAACAATGCC GCGCTCGATG CGCTGGTGGC 5520
 CAATGTGCGC GCGGCACGGC GTGACCGCGG CATCCTCGGC ATCAACATCG GCAAGAACAA 5580
 GGACACCCCC AACGAGCTGG CCCATACCGA TTACCTGACC TGCCTGAAA AGGTGTACGC 5640
 GCTGGCCGAC TACATACCG TCAACATCTC CTCGCCAAC ACCGCCGGGC TCGCGAGCT 5700
 GCAGGAAGAA CAGGCCCTGC GCGAGCTGGT CAGCCGCTG CGCGAGGGCC AGGAAACCCT 5760
 GGCCGCACGC CATGGCAAGC GGGTGCCGAT GCTGGTCAAG GTCGCGCCGG ACCTGAGCGA 5820
 TGCCGATGTC GATGCCGCCG CCCGTGTGCT GGCAGAGCTG CAGGTGGACG GGGTGATCGC 5880
 CACCAACACC ACCATCGCGC GCGTGGGCAT GGAAAACCAC CCACTGGCCA GCGAGGCCGG 5940
 CGGCCTGTCC GGGGCACCGG TGATGGCGCG CTCACCGCG GTGCTGCGCC GCCTGCGCAC 6000
 CCGGCTGCCG GAGTCGATCC CGCTGATCGG CGTCGGCGGC ATCTGTTCCG GGGCTGATGC 6060
 GGCGGCCAAG ATGAGTGCCG GCGCGACCAT GGTGCAGCTC TACAGCGGGC TGGTTTACCG 6120
 CGGCCCCGCA CTGGTCGGCG AATGCGTCGA ATCGATCCGC CGCCGGCGCG AAGCGCCCTC 6180
 CAGCGGGGTA GCCCATCTGT GAGTACGCCG GGCTGGCAGC TGCACCACGA TGTCGCACTG 6240

特平 1 0 - 2 3 2 3 8 2

CAATCAATGA ACACCTTCGG GGTAGCGGCC ACCGCGCCGC GCCTGCTGCG CGTGACGAC 6300
AGCCAGGCCC TGCCGGCGGC GCTGGCGCAC CCGGAAGTAG CCGGACAGCC GTTGATC 6357

【図面の簡単な説明】

【図1】

F. lutescens の変異株によるL-ホモグルタミン酸生産の薄層クロマトグラフィーによる分析結果。Stは、標準のL-ホモグルタミン酸であり、レーン1～4は第一変異株、レーン5～7は第二変異株、レーン8～10は第三変異株、レーン11は野生型株、レーン12および13はプラスミドpCF704を有する第一変異株の分析結果を、それぞれ示す。

【図2】

F. lutescens の変異株のリジン6-アミノトランスフェラーゼ(LAT)活性を示すグラフである。Wildは野生型株、1stは第一変異株、2ndは第二変異株、3rdは第三変異株のLAT活性を示す。

【図3】

プラスミドpCF213によるL-ホモグルタミン酸生産性欠損変異株のL-ホモグルタミン酸生産性の相補性を示す薄層クロマトグラフィーによる分析の結果を示す。

HGはL-ホモグルタミン酸の移動位置を、LysはL-リジンの移動位置を示し、そしてStはL-ホモグルタミン酸標準物質の、1st pCF213、2nd pCF213および3rd pCF213は、それぞれpCF213を有する第一、第二および第三変異株の培養物の、Wild pCF213およびWild pCF704は、それぞれpCF213およびpCF704を有する野生型株の培養物の、1st pCF704および2nd pCF704は、それぞれpCF704を有する第一および第二変異株の培養物の、ならびに1st pCF111はpCF111を有する第一変異株の培養物のTLC分析結果である。

【図4】

F. lutescens IFO 3084 (pCF213) (図中、pCF213と表示) および *F. lutescens* IFO 3084 (pCF704) (図中、pCF704と表示) の経時的なL-ホモグルタミン酸の生産性を示すグラフである。

【図5】

pCF213インサート領域の塩基配列に基づき見いだされたORFの存在位

特平 10-232382

置を示す図である。

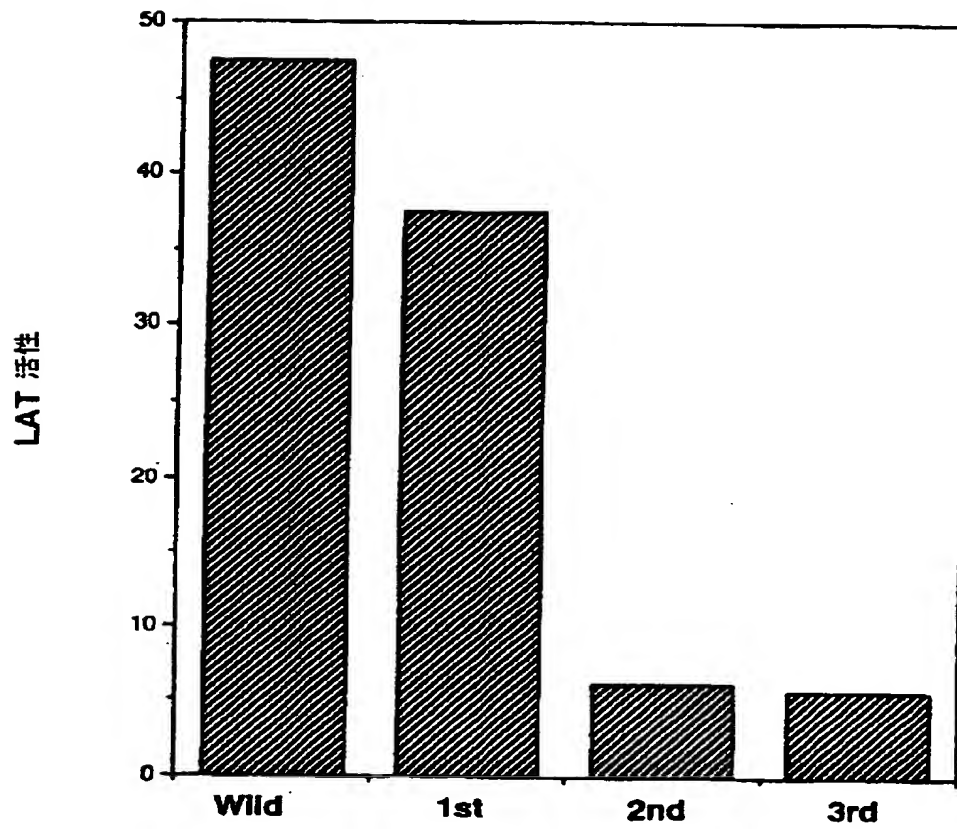
【書類名】

図面

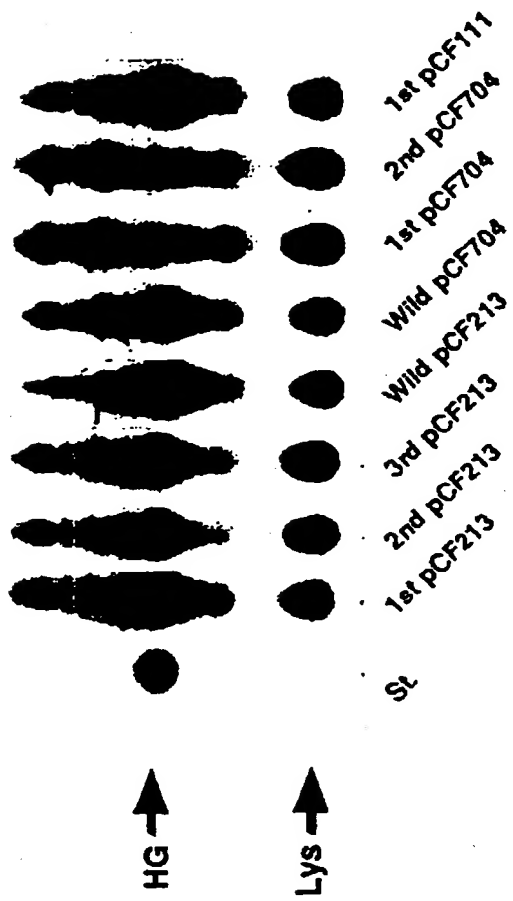
【図1】



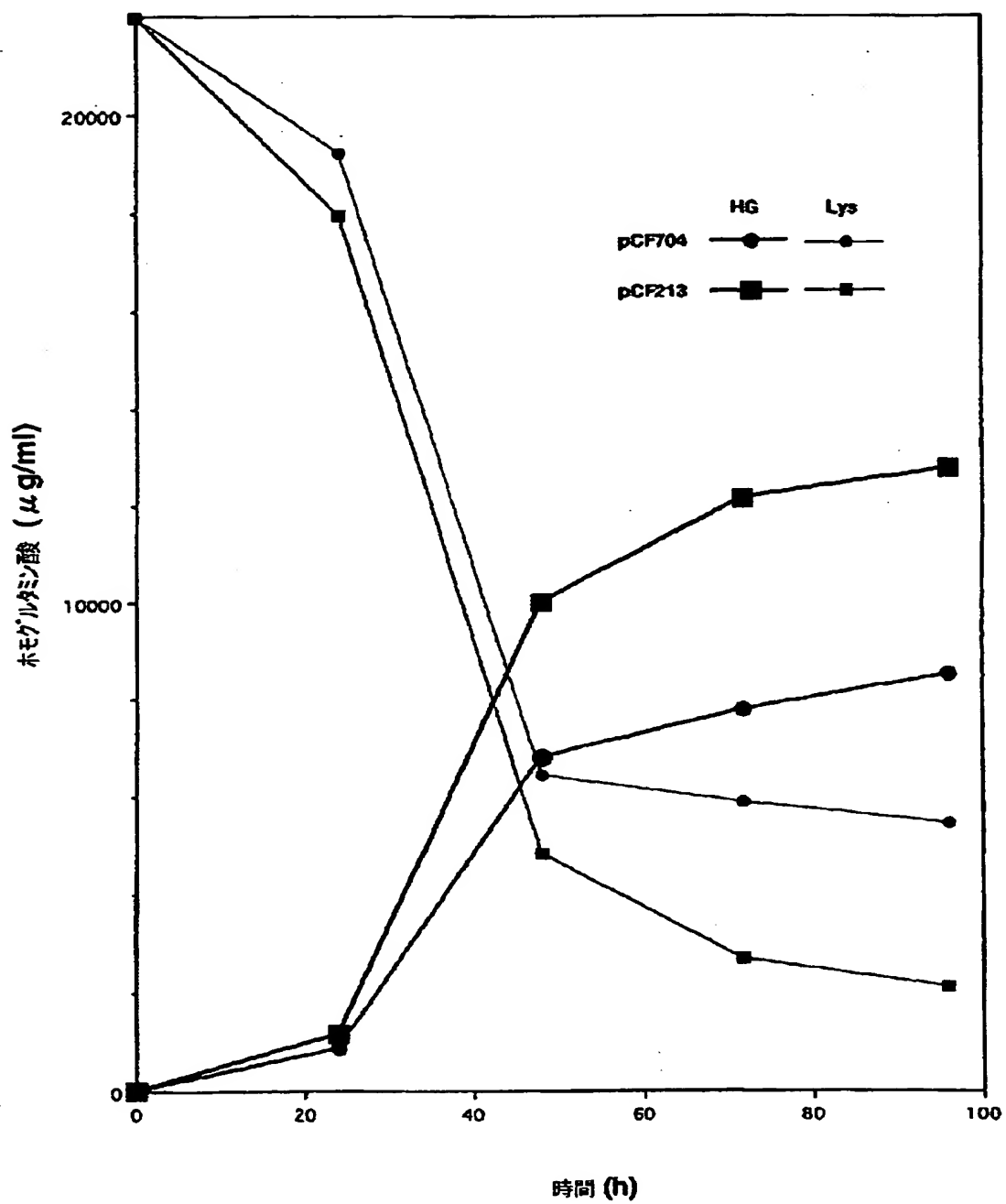
【図 2】



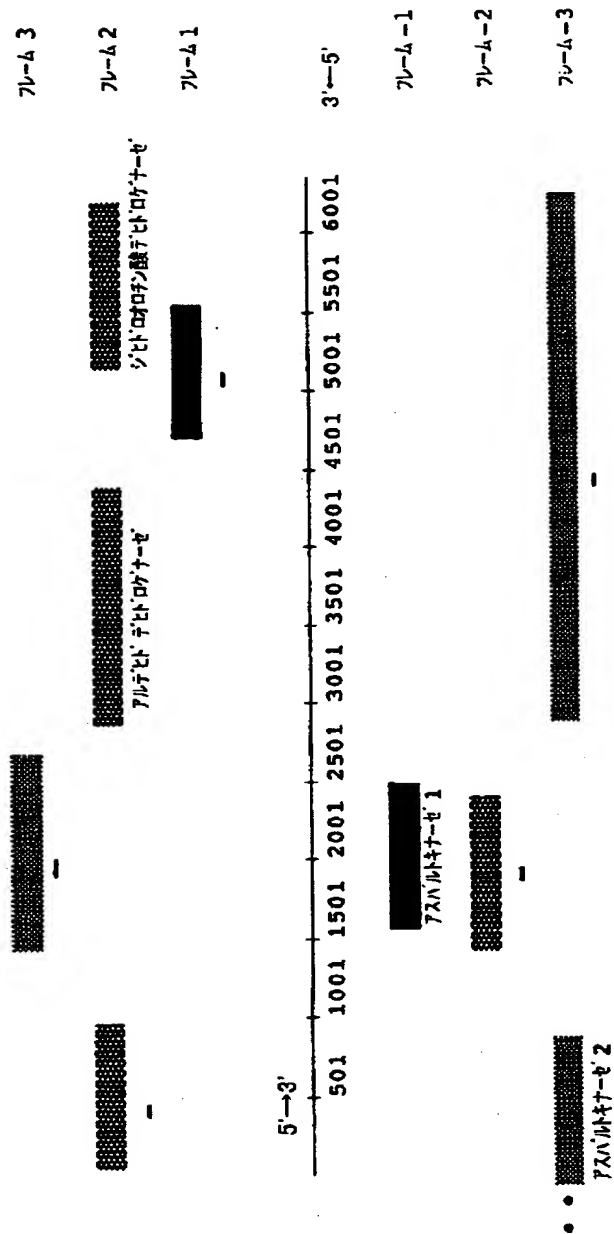
【図 3】



【図 4】



【図 5】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 L-ホモグルタミン酸の生産に関与しうる単離された遺伝子、その遺伝子を用いるL-ホモグルタミン酸の生産系の提供。

【解決手段】 フラボバクテリウム リュテセンス (*Flavobacterium lutescens*) のゲノムから単離されたL-ホモグルタミン酸の生産に関与する遺伝子、該遺伝子を用いるL-ホモグルタミン酸の生産。

【選択図】 なし



書式 7

受 託 証

通知番号 : 10 生寄文 第 362 号

通知年月日: 平成 10 年 3 月 11 日

メルシャン株式会社
取締役社長 鈴木 忠雄 殿

工業技術院生命工学工業技術研究所

大 簿 係



1. 微生物の表示	
<p>(寄託者が付した識別のための表示)</p> <p><i>Flavobacterium lutescens</i> IFO 3084 (pCF213)</p>	<p>(受託番号)</p> <p>FERM P- 16699</p>
2. 科学的性質及び分類学上の位置	
<p>1 綱の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。</p> <p><input type="checkbox"/> 科学的性質</p> <p><input type="checkbox"/> 分類学上の位置</p>	
3. 受領及び受託	
<p>当所は、平成 10 年 3 月 11 日に受領した 1 綱の微生物を受託する。</p>	



書式 7

受 託 証

通知番号 : 10 生寄文 第 891 号

通知年月日 : 平成 10 年 7 月 6 日

メルシヤン株式会社
取締役社長 鈴木 忠雄 殿

工業技術院生命工学工業技術研究所

大 箸 館



1. 微生物の表示	
(寄託者が付した識別のための表示) Flavobacterium lutescens 2nd mutant	(受託番号) FERM P- 16874
2. 科学的性質及び分類学上の位置	
1 種の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。	
<input type="checkbox"/> 科学的性質	
<input type="checkbox"/> 分類学上の位置	
3. 受領及び受託	
当所は、平成 10 年 7 月 6 日に受領した 1 種の微生物を受託する。	

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】
【識別番号】 000001915
【住所又は居所】 東京都中央区京橋1丁目5番8号
【氏名又は名称】 メルシャン株式会社
【代理人】 申請人
【識別番号】 100060782
【住所又は居所】 東京都港区赤坂1-9-15 日本自転車会館内
【氏名又は名称】 小田島 平吉
【代理人】 申請人
【識別番号】 100094293
【住所又は居所】 東京都港区赤坂1丁目9番15号 日本自転車会館
小田島特許事務所
【氏名又は名称】 藤井 幸喜
【代理人】 申請人
【識別番号】 100103311
【住所又は居所】 東京都港区赤坂1丁目9番15号 日本自転車会館
【氏名又は名称】 小田嶋 平吾
【提出された物件の記事】
【提出物件名】 受託証 2

特平10-232382

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000001915]

1. 変更年月日 1990年 8月 8日
[変更理由] 新規登録
住 所 東京都中央区京橋1丁目5番8号
氏 名 メルシャン株式会社

THIS PAGE BLANK (USPTO)